клеток значительно снижено, время подвижного состояния после процедуры замораживания-оттаивания для вариантов криозащитного раствора 1 и 3 не отличается от свежей спермы. C, D - параметры кристаллов, образующихся в режимах охлаждения 1, 2, показанных на рис 1.

Медленное (5° С/мин) охлаждение (светлые столбцы) и быстрое (150° С/мин) охлаждение (темные столбцы). При сверхбыстром (около 3000° С/мин) охлаждении в тонком слое среды (режим 3) кристаллы не образуются

Работа выполнена при совместной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства промышленности и науки Московской области (грант № 04-04-97300).

РЕЗЮМЕ

Изучали влияние добавочных компонентов криозащитной среды и скорости ее охлаждения на криоконсервацию спермы рыб. Показано, что скорость охлаждения и дополнительные компоненты криозащитной среды могут эффективно влиять на размер и форму кристаллов льда и выживаемость спермиев после процедуры замораживания-оттаивания.

ABSTRACT

Influence of additional components and velocity of the cooling on freezing cryoprotective medium has been studied using a cryomicroscopy technique. It has been shown that additional components and cooling rate on the freezing of cryoprotective medium fundamentally change the ice crystal area and survival of fish spermatozoa at procedure of freezing-thawing.

Литература

1. Maisse G. Cryopreservation of fish semen. Refrigeration and Aquaculture. Bordeaux, 1996, p. 443-457.

2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. К., «Наукова думка», 1994, 431 с.

УДК: 615.361.018.46.014.41:57.084:547.42

Л.А. Водопьянова, Г.Ф. Жегунов

Харьковская государственная зооветеринарная академия

СОХРАННОСТЬ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА СОБАК ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С КРИОПРОТЕКТОРАМИ И КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ В ЖИДКОМ АЗОТЕ

В настоящее время интенсивно используются методы лечения тяжелых форм различных заболеваний (анемия, нарушения гемопоэза, иммунодефициты и др.) с помощью клеток костного мозга, которые могут развиваться в различные клетки крови [8].

Замораживание в жидком азоте с криопротектором позволяет хранить клетки донора в течении нескольких лет [7, 8].

В настоящее время для криоконсервирования клеток костного мозга человека используются диметилсульфоксид (ДМСО), полиэтиленоксид М.м. 400 (ПЭО-400), глицерин и другие криопротекторы [2, 3]. В ветеринарии еще не разработаны методы криоконсервирования костного мозга, хотя этот вопрос является актуальным и перспективным.

Цель исследования - оценить чувствительности клеток костного мозга собак к действию некоторых криопротекторов, а так же выявить их сохранность после замораживания в жидком азоте.

Конечная концентрация ДМСО при добавлении к суспензии костного мозга была 10%, 7%, 5%, ПЭО-400 - 10%, 15%, 20% , глицерин 10%, 20%, 30%. Инкубация с ДМСО проводилась 10 минут, ПЭО-400 и глицерином 30 минут в условиях + 4° С.

Замораживание проводилось двухступенчато: первый этап - погружение в пары азота (-80° С, температура контролировалась термопарой), второй этап погружение в жидкий азот [4-8]. Размораживание проб производили на водяной бане +41° С при постоянном покачивании в течении 1-3 минут.

Удаление криопротектора из суспензии проводили с помощью рабочей среды, добавленной в 5-10 кратном объеме к суспензии с дальнейшим центрифугированием.

Как метод оценки сохранности клеток костного мозга применяли прижизненную окраску с трипановым синим. Средний показатель сохранности клеток в свежеполу-

ченной суспензии 98,25±0,3%. Количество клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева [1].

Показано, что процесс замораживания-отогрева без криопротектора оказывается очень неблагоприятным для клеток костного мозга собак. После указанного процесса сохраняется только 6% клеток. Это обуславливает применение криопротекторов для замораживания.

Установлено, что все исследованные криопротекторы не оказывают существенного влияния на жизнеспособность клеток костного мозга собак. После действия криопротектора их сохранность не отличалась существенно от показателей в свежеполученной суспензии и составляла от 87 до 92%. Наиболее «щадящими» были 10% растворы глицерина и ПЭО-400, сохраняющие до 92% клеток костного мозга собак.

Однако самым эффективным криопротектором при криоконсервировании оказался ДМСО. В частности, после замораживания в присутствии 7% ДМСО сохранность клеток составляла до 83%. ПЭО-400 и глицерин оказались менее эффективными. В присутствии глицерина сохраняется только 59% клеток костного мозга, а ПЭО сохраняет до 74%. Наименьший показатель сохранности в пробах, замороженных под защитой 30% глицерина – 45%.

Известно, что ДМСО – низкомолекулярное вещество, проникающее в клетку (эндоцелюлярный криопротектор) [2]. Хотя он обеспечивает эффективную защиту при криоконсервации, однако обладают токсическими свойствами [14]. Этим объясняется несколько высокая чувствительность клеток костного мозга собак к ДМСО при инкубации, по сравнению с глицерином и ПЭО-400. Поэтому концентрации 5-7% ДМСО считают наиболее приемлемыми для гемапоэтических клеток при кратковременной экспозиции [5].

Глицерин также как и ДМСО относится к проникающим криопротекторам. Его токсический эффект менее выражен и проявился только в пробах с высокой концентрацией вещества. Однако он оказался менее эффективным криопротектором.

Известно, что проницаемость плазматических мембран для глицерина при температурах близких к 0° С, у большинства типов клеток существенно снижена, и в этом случае глицерин действует только как экзоцелюлярный криопроткетор [2]. Видимо, этим можно объяснить низкую сохранность клеток костного мозга собак после криоконсервации в присутствии глицерина.

ПЭО-400 – не проникающий криопротектор, обладающий низкой токсичностью. Он оказался достаточно эффективным (сохранность до 74%) при замораживании, но не на столько как ДМСО.

Выводы

Таким образом установлено, что сохранность клеток костного мозга собак, замороженных в жидком азоте без применения криопротекторов, чрезвычайно мала, что подтверждает необходимость применения криозащиты.

Большая сохранность клеток костного мозга собак была после инкубации с глицерином и ПЭО-400.

Все криопротекторы оказали защитное действие, сохраняя до 70% сохранных клеток. ДМСО оказался более эффективным криопротектором, обеспечив наибольшую сохранность клеток после замораживания.

SUMMARY

The viability of dog`s bone marrow cells after incubation with cryoprotectants and cryoconservation in liquid nitrogen have been studied. The method uses DMSO, PEO-400, glycerol as cryoprotectants. It has been found that the viability of dog`s bone marrow cells after cryoconservation in liquid nitrogen without cryoprotectant was very small – 5%. The 7% DMSO was most effective then other and protected more then 80% of cells.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. К.: Наукова думка, 1994. 430 с.
2. Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С. Криоконсерванты. К.: Наукова думка, 1979. 197с.
3. Пушкарь Н.С., Цуцаева А.А., Иткин Ю.А., Шраго М.И. Минестерство здравоохранения СССР. Консервирование костного мозга при ультранизких температурах с ПЭО-400. Метод. реком. ИПКиК, Центральный науч. иссл. инст. гематологии и переливания крови МЗСССР. 1984. С. 11.
4. Galmes A., Besalduch J., Bargay J., Matamoros N., Duran M.A., Morey M., Alvarez F., Mascaro M. Criopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at – 80 degrees C without rare-controlled freezing // Transfusion. 1996. 36 (9). P. 794-797.
5. Kawano Y., Lee C.L., Watanabe T., Abe T., Suzuya H., Okamoto Y., Makimoto A., Nakagawa R., Watanaba H., Takahe Y. Cryopreservation of mobilized blood stem cells concentration without the use of a programmed frezer // Ann hematol. 2004. 83 (1). P. 50-54.
6. Stiff P.J., Murgo A.J., Zaroulis C.G., De Risi M.F., Clarkson B.D. Ulfractionated human marrow cell cryopreservation usin dimethylsuifoxide and hydroxyethyl starch // Cryobiology. 1983. 20 (1). P. 17-24.
7. Van de Ouweland F., De Witte T., Geerdink P., Haanen C. Enricliment and cryopreservation of bone marrow progenitor cells for antologous reinfusion // Cryobiology. 1982. 19 (3). P. 292-298.